

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE



In re PATENT APPLICATION of  
Inventor(s): FARWICK et al.

Appln. No.: 09 | 825,293  
Series Code ↑ | ↑ Serial No.

Group Art Unit: To Be Assigned

Filed: April 4, 2001

Examiner: To Be Assigned

Title: Novel Nucleotide Sequences Encoding the mikE-17 Gene

Atty. Dkt. P 280108 | 000561 BT  
M# | Client Ref

Date: November 23, 2001

**SUBMISSION OF PRIORITY  
DOCUMENT IN ACCORDANCE  
WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55**

Hon. Asst Commissioner of Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

<u>Application No.</u>	<u>Country of Origin</u>	<u>Filed</u>
101 13 958.6	GERMANY	March 22, 2001

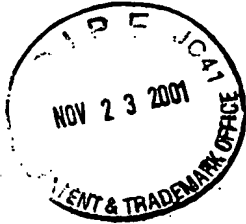
Respectfully submitted,

Pillsbury Winthrop LLP  
Intellectual Property Group

1100 New York Avenue, NW  
Ninth Floor  
Washington, DC 20005-3918  
Tel: (202) 861-3000  
Atty/Sec: MAS/AMX

By Atty: Michael A. Sanzo Reg. No. 36912  
Sig: Michael A. Sanzo Fax: (202) 822-0944  
Tel: (202) 861-3020

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 13 958.6

**Anmeldetag:** 22. März 2001

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG,  
Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Neue für das mikE17-Gen kodierende Nukleotid-  
sequenzen

**Priorität:** 27.09.2000 DE 100 47 867.0

**IPC:** C 07 H, C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Juli 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Agurks

### Neue für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren unter Verwendung von Bakterien, in denen das mikE17-Gen abgeschwächt wird.

#### Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und die Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-

Aminosäure produzierenden Stämmen von Corynebacterium eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Aminosäure-Produktion untersucht.

## 5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren bereitzustellen.

## Beschreibung der Erfindung

- 10 Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist/sind L-Lysin.

- Wenn im folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern auch die Salze wie z.B. 20 Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien, enthaltend eine für das mikE17-Gen kodierende Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 25 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% 30 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

5 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des Transkriptionsregulators MikE17 aufweist.

10 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das oben genannte Polynukleotid, wobei es sich bevorzugt um eine replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No.1, oder

15 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder

(iii) mindestens eine Sequenz, die mit den zu den Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisiert, und gegebenenfalls

(iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

20 Weitere Gegenstände sind:

ein replizierbares Polynukleotid, insbesondere DNA, enthaltend die Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID No.1 dargestellt;

25 ein Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält;

ein Vektor, enthaltend Teile des erfindungsgemäßen Polynukleotids, mindestens aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der beanspruchten Sequenz,

und coryneforme Bakterien, in denen das mikE17-Gen, insbesondere durch eine Insertion oder Deletion, abgeschwächt ist.

5 Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank eines coryneformen Bakteriums, die das vollständige Gen oder Teile davon enthält, mit einer Sonde, die die Sequenz des erfindungsgemäßen  
10 Polynukleotids gemäß SEQ ID No.1 oder ein Fragment davon , enthält und Isolierung der genannten Polynukleotidsequenz.

Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind als Hybridisierungssonden für RNA, cDNA und DNA geeignet, um Nukleinsäuren beziehungsweise  
15 Polynukleotide oder Gene in voller Länge zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator MikE17 kodieren, oder um solche Nukleinsäuren beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des mikE17-Gens aufweisen.

20 Polynukleotide, die die Sequenzen gemäß der Erfindung enthalten, sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für den  
Transkriptionsregulator MikE17 kodieren.

25 Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Nukleotiden.

30 „Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

„Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es

sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

Die Polynukleotide gemäß Erfindung schließen ein Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder ein daraus  
5 hergestelltes Fragment und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polynukleotid gemäß SEQ ID No. 1 oder eines daraus hergestellten Fragments.

10 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen ein Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der  
15 biologischen Aktivität des Transkriptionsregulators MikE17 und auch solche ein, die zu wenigstens 70%, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90% bis 95% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin,  
25 L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits Aminosäuren produzieren und in denen die für das mikE17-Gen kodierenden Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

30 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die

entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*), sind besonders die bekannten Wildtypstämme

*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032  
*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806  
*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870  
*Corynebacterium melassecola* ATCC17965  
*Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539  
*Brevibacterium flavum* ATCC14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und  
*Brevibacterium divaricatum* ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten beziehungsweise Stämme.

Das neue, für den Transkriptionsregulator *mikE17* kodierende *mikE17*-Gen von *C. glutamicum* wurde isoliert.

Zur Isolierung des *mikE17*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *Escherichia coli* (*E. coli*) angelegt. Das



- Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990), oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495-508 (1987)) in  $\lambda$ -Vektoren angelegt wurde.
- 10 Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im E. coli K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 15 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde.
- Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326 (1992)) wiederum beschreiben eine Genbank von C. glutamicum ATCC13032 unter Verwendung des Cosmides pH79 (Hohn und Collins, 1980, Gene 11, 291-298).
- 20 Zur Herstellung einer Genbank von C. glutamicum in E. coli können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, 1979, Life Sciences, 25, 807-818) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche E. coli-Stämme, die restriktions- und
- 25 rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 $\alpha$ mc<sup>r</sup>, der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde. Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen  $\lambda$ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend
- 30 wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert und anschließend sequenziert werden, so wie es z. B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74:5463-5467, 1977) beschrieben ist.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z.B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem von Marck (Nucleic Acids Research 16, 1829-1836 (1988)) oder dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)) untersucht werden.

Die neue für das mikel7-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum wurde gefunden, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des mikel7-Genproduktes dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Kodes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 2 ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben. Derartige Oligonukleotide haben typischerweise eine Länge von mindestens 15 Nukleotiden.

Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al. (International Journal of Systematic Bacteriology 41: 255-260 (1991)). Die Hybridisierung findet unter stringenten Bedingungen statt, das heisst, es werden nur Hybride gebildet, bei denen Sonde und Zielsequenz, d. h. die mit der Sonde behandelten Polynukleotide, mindestens 70% identisch sind. Es ist bekannt, dass die Stringenz der Hybridisierung einschließlich der Waschschriffe durch Variieren der Pufferzusammensetzung, der Temperatur und der Salzkonzentration beeinflusst bzw. bestimmt wird. Die Hybridisierungsreaktion wird vorzugsweise bei relativ niedriger Stringenz im Vergleich zu den Waschschriffen durchgeführt (Hybaid Hybridisation Guide, Hybaid Limited, Teddington, UK, 1996).

Für die Hybridisierungsreaktion kann beispielsweise ein 5x SSC-Puffer bei einer Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingesetzt werden. Dabei können Sonden auch mit Polynukleotiden hybridisieren, die weniger als 70% Identität zur Sequenz der Sonde aufweisen. Solche Hybride sind weniger stabil und werden durch Waschen unter stringenten Bedingungen entfernt. Dies kann beispielsweise durch Senken der Salzkonzentration auf 2x SSC und gegebenenfalls nachfolgend 0,5x SSC (The DIG System User's Guide for Filter Hybridisation, Boehringer Mannheim,

Mannheim, Deutschland, 1995) erreicht werden, wobei eine Temperatur von ca. 50°C - 68°C eingestellt wird. Es ist gegebenenfalls möglich die Salzkonzentration bis auf 0,1x SSC zu senken. Durch schrittweise Erhöhung der

5 Hybridisierungstemperatur in Schritten von ca. 1 - 2°C von 50°C auf 68°C können Polynukleotidfragmente isoliert werden, die beispielsweise mindestens 70% oder mindestens 80% oder mindestens 90% bis 95% Identität zur Sequenz der eingesetzten Sonde besitzen. Weitere Anleitungen zur

10 Hybridisierung sind in Form sogenannter Kits am Markt erhältlich (z.B. DIG Easy Hyb von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland, Catalog No. 1603558).

Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe

15 der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

20 Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des mikE17-Gens in verbesserter Weise Aminosäuren produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des mikE17-Gens oder die regulatorischen

25 Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation)

30 der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in

der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy  
(Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und  
Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei  
Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191  
5 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996)),  
Vasicova et al. (Journal of Bacteriology 181: 6188 (1999))  
und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und  
Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers  
(„Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag,  
10 Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene  
und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland,  
1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der  
katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind  
15 aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die  
Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological  
Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al.  
(Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762  
(1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus  
20 Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen  
Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des  
Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich,  
Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen  
können bekannten Lehrbüchern der Genetik und  
25 Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine  
Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen  
werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen,  
Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von  
30 der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die  
Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense  
mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“)  
gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens  
einem Basenpaar (bp) in einem Gen führen zu  
35 Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in

deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung  
5 derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und  
10 Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology  
15 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen  
20 Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder  
25 pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al.,  
30 Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den  
35 gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode

der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des recA-Gens von C. glutamicum verwendet.

Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“) wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für C. glutamicum nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von C. glutamicum überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das pyc-Gen von C. glutamicum durch eine Deletion auszuschalten.

In das mikE17-Gen kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des mikE17-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen

Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren.

- 5 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen oder 10 Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym (Protein) mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

15 So kann für die Herstellung von L-Aminosäuren neben der Abschwächung des mikE17-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen dapA (EP-B 0 197 335),
- 20 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase kodierende Gen gap (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- 25 • das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),



- das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase kodierende Gen mgo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998)),
- 5 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen lysC (Accession No.P26512; EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE (DE-A-195 48 222),
- 10 • das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende Gen hom (EP-A 0131171),
- das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen ilvA (Möckel et al., Journal of Bacteriology (1992) 8065-8072)) oder das für eine "feed back resistente" Threonin-Dehydratase kodierende Allel ilvA(Fbr) (Möckel et al., 15 (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842),
- das für die Acetohydroxysäure-Synthase kodierenden Gen ilvBN (EP-B 0356739),
- das für die Dihydroxysäuredehydratase kodierende Gen ilvD (Sahm und Eggeling (1999) Applied and Environmental 20 Microbiology 65: 1973-1979),
- das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1 (DE: 19959328.0, DSM 13115)

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

25 Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des mikE17-Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),
- 5 • das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

10 abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern, gegebenenfalls abzuschwächen.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des mikE17-Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: 15 Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren 20 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel 25 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im

Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology„ der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie  
5 z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,  
Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette, wie zum  
Beispiel Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett,  
Fettsäuren, wie zum Beispiel Palmitinsäure, Stearinsäure  
und Linolsäure, Alkohole wie zum Beispiel Glycerin und  
10 Ethanol und organische Säuren, wie zum Beispiel Essigsäure  
verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als  
Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige  
Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt,  
15 Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff  
oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,  
Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und  
Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen  
können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

20 Als Phosphorquelle können Phosphorsäure,  
Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder  
die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.  
Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen  
enthalten, wie zum Beispiel Magnesiumsulfat oder  
25 Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind.  
Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren  
und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen  
eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies  
geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten  
30 Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen  
Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der  
Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen  
wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak

beziehungsweise Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel, wie zum Beispiel Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen, wie zum Beispiel Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann zum Beispiel so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustausch-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren.

Folgender Mikroorganismus wurde am 06.03.2001 als Reinkultur bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli top10/pCR2.1mike17int als DSM 14143.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* sowie alle Techniken zur Restriktion, Klenow- und alkalische Phosphatasebehandlung wurden nach Sambrook et al.

(Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA) durchgeführt. Methoden zur Transformation von *Escherichia coli* sind ebenfalls in diesem Handbuch beschrieben.

Die Zusammensetzung gängiger Nährmedien wie LB- oder TY-Medium kann ebenfalls dem Handbuch von Sambrook et al. entnommen werden.

#### Beispiel 1

Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *C. glutamicum* ATCC 13032

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250) dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten.

Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no.27-0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt.

Zur Infektion des E. coli Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

### Beispiel 2

#### 20 Isolierung und Sequenzierung des Gens mikE17

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany).

Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5 $\alpha$ MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol. Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50  $\mu$ g/ml Zeocin ausplattiert.

Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences, U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die

Einzelsequenzen der pZerol-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembliert. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt.

- 5 Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:33893402) gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

- 10 Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1425 bp, welches als mikE17-Gen bezeichnet wurde. Das mikE17-Gen kodiert für ein Polypeptid von 474 Aminosäuren.

15 Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des mikE17-Gens

- Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994))  
20 chromosomale DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für C. glutamicum bekannten Sequenz des mikE17-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion ausgewählt (siehe SEQ ID No. 3 und SEQ ID No.4):

mikE17-int1:

- 25 5' AAT GGA TCA CGA TGT CAC C 3'

mikE17-int2:

5' TAG TGG GTG AAG TGG AAG C 3'

- Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der  
30 Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit der Taq-Polymerase der Firma Boehringer Mannheim (Deutschland, Produktbeschreibung Taq DNA Polymerase,



Product No. 1 146 165) die PCR Reaktion durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichen die Primer die Amplifikation eines 477 bp großen internen Fragmentes des mikE17-Gens. Das so amplifizierte Produkt wurde in  
5 einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch geprüft.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

10 Anschließend wurde der E. coli Stamm TOP10 mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden Zellen erfolgte durch Ausplattieren des  
15 Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 50 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des  
20 QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1mikE17int genannt und ist in Figur 1 dargestellt.

25 Folgender Mikroorganismus wurde als Reinkultur am 06.03.2001 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapestster Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Top10/pCR2.1mikE17int als DSM 14143.

Beispiel 4

Integrationsmutagenese des mikE17-Gens in dem Stamm DSM 5715

Der in Beispiel 3 genannte Vektor pCR2.1mikE17int wurde  
5 nach der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS  
Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in  
Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem  
Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten  
Lysin-Produzenten (EP-A-435 132). Der Vektor  
10 pCR2.1mikE17int kann in DSM5715 nicht selbständig  
replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn  
er ins Chromosom von DSM 5715 integriert hat. Die Selektion  
von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1mikE17int  
erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes  
15 auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a  
laboratory manual. 2<sup>nd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory  
Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit 15 mg/l Kanamycin  
supplementiert worden war.

Für den Nachweis der Integration wurde das mikE17int-  
20 Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for  
Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH  
(Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-  
Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.  
Chromosomale DNA eines potentiellen Integranten wurde nach  
25 der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 -  
1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den  
Restriktionsenzymen SalI, EcoRI und PstI geschnitten. Die  
entstehenden Fragmente wurden mittels der Agarosegel-  
Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybrisierungskit  
30 der Firma Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel  
3 genannte Plasmid pCR2.1mikE17int hatte innerhalb des  
chromosomalen mikE17-Gens ins Chromosom von DSM5715  
inseriert. Der Stamm wurde als DSM5715::pCR2.1mikE17int  
bezeichnet.

Beispiel 5

## Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 4 erhaltene *C. glutamicum* Stamm  
DSM5715::pCR2.1mikE17int wurde in einem zur Produktion von  
5 Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt  
im Kulturüberstand bestimmt.

10 Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem  
entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin  
(25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von  
dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10  
ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die  
Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet.

## Medium Cg III

NaCl 2,5 g/l

Bacto-Pepton 10 g/l

Bacto-Yeast-Extrakt 10 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 2% (w/v)

Der pH-Wert wurde auf pH 7.4  
eingestellt

15 Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur  
wurde 16 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler  
inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur  
angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660 nm) der Hauptkultur  
0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM  
verwendet

## Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor)	5 g/l
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	20 g/l
Glucose (getrennt autoklaviert)	50g/l
Salze:	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	25 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	1,0 g/l
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	5,0mg/l
Biotin (sterilfiltriert)	0,3 mg/l
Thiamin * HCl (sterilfiltriert)	0,2 mg/l
Leucin (sterilfiltriert)	0,1 g/l
CaCO <sub>3</sub>	25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO<sub>3</sub> zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

10 Nach 72 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH,

München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion  
5 bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	7,4	13,05
DSM5715::pCR2.1mikE17int	7,6	15,14

Folgende Figur ist beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1mikE17int.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

KmR:	Kanamycin Resistenz-Gen
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym EcoRI
PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzym PstI
Sall:	Schnittstelle des Restriktionsenzym Sall
mikE17int:	internes Fragment des mikE17-Gens
ColE1:	Replikationsursprung des Plasmides ColE1

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Degussa AG

5 &lt;120&gt; Neue für das mikE17-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

&lt;130&gt; 000561 BT

&lt;140&gt;

10 &lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

15 &lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1890

&lt;212&gt; DNA

20 &lt;213&gt; Corynebacterium glutamicum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (252)..(1673)

25 &lt;223&gt; mikE17-Gen

&lt;400&gt; 1

aaccgccgttt ggtatcaacc aaaaagttaa gacagcccaa ccttccgatac cagggagcaa 60

30 ctttgccgag gtgacacaat tatcccaaca gttgcaccgt aggtgcctaa aaagttcccg 120

gggcggatgt ggcccgaacca cgccgggcac ctggtggcgg cgggctgcgt cgaaaagcga 180

aaatcaacaa gtttgcaaca cctcagtgcc aagagtgggtt aaggtgatgg tgatcacgct 240

35 atagttgcgc c atg gga aag aca tat gtg ggg tcc agg ctg cgc caa ctg 290  
Met Gly Lys Thr Tyr Val Gly Ser Arg Leu Arg Gln Leu  
1 5 1040 cgc cgc gaa aga gac ctg agc cag gca tcc tta gca gca acc ctt ggc 338  
Arg Arg Glu Arg Asp Leu Ser Gln Ala Ser Leu Ala Ala Thr Leu Gly  
15 20 2545 tta tct gca agt tat gta aat cag att gag cac gac gta cgc ccg ctc 386  
Leu Ser Ala Ser Tyr Val Asn Gln Ile Glu His Asp Val Arg Pro Leu  
30 35 40 4550 acc gta ccg gtg tta ttg cgc atc acc gag gcg ttc ggc gta gac gca 434  
Thr Val Pro Val Leu Leu Arg Ile Thr Glu Ala Phe Gly Val Asp Ala  
50 55 60acg ttt ttc tcc cgc gac gat gac tcc cgc ctg ctc gcc gag gtc caa 482  
Thr Phe Phe Ser Arg Asp Asp Asp Ser Arg Leu Leu Ala Glu Val Gln  
65 70 7555 gac gtc atg ctg gac cgg gag atc aat cct gcg aac gtg gag ctg caa 530  
Asp Val Met Leu Asp Arg Glu Ile Asn Pro Ala Asn Val Glu Leu Gln  
80 85 90

	gag ctt tcg gag atg gtg tac aac cac ccc caa cta gcg cgc gcg atg	578
	Glu Leu Ser Glu Met Val Tyr Asn His Pro Gln Leu Ala Arg Ala Met	
	95 100 105	
5	gtg gaa atg cac cag cgt tac cga aac gtg cgc gat aag ttc tcc atc	626
	Val Glu Met His Gln Arg Tyr Arg Asn Val Arg Asp Lys Phe Ser Ile	
	110 115 120 125	
10	gca gtg gat aat cgc acc aac acg cct gag gaa cgc cgt ccc atc gcg	674
	Ala Val Asp Asn Arg Thr Asn Thr Pro Glu Glu Arg Arg Pro Ile Ala	
	130 135 140	
15	gag gcc gtg agc atg ccg cac gaa gag gtc cgc gat ttc att tac gcc	722
	Glu Ala Val Ser Met Pro His Glu Glu Val Arg Asp Phe Ile Tyr Ala	
	145 150 155	
20	cgc caa aac tac ttc gat gcc ctt gag cgc cgc gcc gaa gcc atc gcc	770
	Arg Gln Asn Tyr Phe Asp Ala Leu Asp Arg Arg Ala Glu Ala Ile Ala	
	160 165 170	
25	gcg caa ctg ggc tgg cag ccg tac gat tcc cgc gcc atg gaa gat tcg	818
	Ala Gln Leu Gly Trp Gln Pro Tyr Asp Ser Arg Ala Met Glu Asp Ser	
	175 180 185	
30	atc gcc cgc cgc ctg caa atg gat cac gat gtc acc atc acc tcc tcc	866
	Ile Ala Arg Arg Leu Gln Met Asp His Asp Val Thr Ile Thr Ser Ser	
	190 195 200 205	
35	aaa gag gaa tcc ggc acg ctg cac cac ttc gac ccc gag acg cgt ctg	914
	Lys Glu Glu Ser Gly Thr Leu His His Phe Asp Pro Glu Thr Arg Leu	
	210 215 220	
40	ctg aca atc cac gca cgc ctc aac ccc ggg caa cgc gcc ttc cgc atg	962
	Leu Thr Ile His Ala Arg Leu Asn Pro Gly Gln Arg Ala Phe Arg Met	
	225 230 235	
45	gcc acc gaa ctc ggc tac cta gaa gcc aac gac ctc atc gaa ggt atc	1010
	Ala Thr Glu Leu Gly Tyr Leu Glu Ala Asn Asp Leu Ile Glu Gly Ile	
	240 245 250	
50	gtt gac gac ggc atc tgg tcc acc ccc gaa gcc cgc acc cta gcc atc	1058
	Val Asp Asp Gly Ile Trp Ser Thr Pro Glu Ala Arg Thr Leu Ala Ile	
	255 260 265	
55	cgc ggt gtg gcc tcc tac ttc gcc gcc gcc gtg atg ctg ccc tac aaa	1106
	Arg Gly Val Ala Ser Tyr Phe Ala Ala Ala Val Met Leu Pro Tyr Lys	
	270 275 280 285	
60	atc ttc cac tcc gag gcc gaa aaa tcc ggc tac gac atc gag tac cta	1154
	Ile Phe His Ser Glu Ala Glu Lys Ser Gly Tyr Asp Ile Glu Tyr Leu	
	290 295 300	
65	ggc caa ctc ttt ggc gtg ggc tat gag aca acc gcc cac cgc ttg tcc	1202
	Gly Gln Leu Phe Gly Val Gly Tyr Glu Thr Thr Ala His Arg Leu Ser	
	305 310 315	



5 acc ctg cag cgc ccc aac ctg cgc ggc atc ccc ttt acc ttc gtg cgc 1250  
 Thr Leu Gln Arg Pro Asn Leu Arg Gly Ile Pro Phe Thr Phe Val Arg  
 320 325 330  
 gtc gac cgc gcc ggc aac atg tcc aaa cgc caa tcc gcc acc ggc ttc 1298  
 Val Asp Arg Ala Gly Asn Met Ser Lys Arg Gln Ser Ala Thr Gly Phe  
 335 340 345  
 10 cac ttc acc cac tac ggc ggc acc tgc ccc ctg tgg aac gtg ttt gaa 1346  
 His Phe Thr His Tyr Gly Gly Thr Cys Pro Leu Trp Asn Val Phe Glu  
 350 355 360 365  
 15 acc ttc acc aac ccc ggc caa gtg ctc cgc caa ttc gcg caa atg ccc 1394  
 Thr Phe Thr Asn Pro Gly Gln Val Leu Arg Gln Phe Ala Gln Met Pro  
 370 375 380  
 20 gac gga cgc aac tac ctg tgg atc tca cgc acc gtg cga cac cac gaa 1442  
 Asp Gly Arg Asn Tyr Leu Trp Ile Ser Arg Thr Val Arg His His Glu  
 385 390 395  
 gcc cgg ttc ggc gaa gta gac aaa atg ttc gcc atc ggc ctg ggc tgc 1490  
 Ala Arg Phe Gly Glu Val Asp Lys Met Phe Ala Ile Gly Leu Gly Cys  
 400 405 410  
 25 gaa gcg cgc cac gcc gac cgc act gtg tac tcc cgc ggt ttc aac ctc 1538  
 Glu Ala Arg His Ala Asp Arg Thr Val Tyr Ser Arg Gly Phe Asn Leu  
 415 420 425  
 30 cag gac ctc tcc acc gcc acc ccc atc ggg tcc ggc tgc cga gtg tgc 1586  
 Gln Asp Leu Ser Thr Ala Thr Pro Ile Gly Ser Gly Cys Arg Val Cys  
 430 435 440 445  
 35 acc cgc gag aac tgc gcg cag cgc gca ttc cca tcc gtc cac ggc cgc 1634  
 Thr Arg Glu Asn Cys Ala Gln Arg Ala Phe Pro Ser Val His Gly Arg  
 450 455 460  
 40 atc aac atc gac gcg cac gaa tcc act atc gcg ccg tac taagaaaagg 1683  
 Ile Asn Ile Asp Ala His Glu Ser Thr Ile Ala Pro Tyr  
 465 470  
 agcttgcttt acgacgcacc ctgcgggggt gggttttacc ttttatgaat gatcagcaat 1743  
 atccgcgtaa acaccatcgg tagccagaag aacatcatcc ggggcgataa tcagggacca 1803  
 45 cccgcgtcgc cctgcgctga cgtagattcg ctcttgagaga attgcagact catccaaaaa 1863  
 cacgcggtgc ttgttcttct gccctat 1890  
 50  
 <210> 2  
 <211> 474  
 <212> PRT  
 <213> Corynebacterium glutamicum  
 55  
 <400> 2  
 Met Gly Lys Thr Tyr Val Gly Ser Arg Leu Arg Gln Leu Arg Arg Glu  
 1 5 10 15

	Arg	Asp	Leu	Ser	Gln	Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Gly	Leu	Ser	Ala	
				20					25					30			
5	Ser	Tyr	Val	Asn	Gln	Ile	Glu	His	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Thr	Val	Pro	
			35				40					45					
	Val	Leu	Leu	Arg	Ile	Thr	Glu	Ala	Phe	Gly	Val	Asp	Ala	Thr	Phe	Phe	
		50					55					60					
10	Ser	Arg	Asp	Asp	Asp	Ser	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	Val	Gln	Asp	Val	Met	
	65					70					75					80	
	Leu	Asp	Arg	Glu	Ile	Asn	Pro	Ala	Asn	Val	Glu	Leu	Gln	Glu	Leu	Ser	
					85					90					95		
15	Glu	Met	Val	Tyr	Asn	His	Pro	Gln	Leu	Ala	Arg	Ala	Met	Val	Glu	Met	
				100					105					110			
	His	Gln	Arg	Tyr	Arg	Asn	Val	Arg	Asp	Lys	Phe	Ser	Ile	Ala	Val	Asp	
20			115					120					125				
	Asn	Arg	Thr	Asn	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	Arg	Pro	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	
	130						135					140					
25	Ser	Met	Pro	His	Glu	Glu	Val	Arg	Asp	Phe	Ile	Tyr	Ala	Arg	Gln	Asn	
	145					150					155					160	
	Tyr	Phe	Asp	Ala	Leu	Asp	Arg	Arg	Ala	Glu	Ala	Ile	Ala	Ala	Gln	Leu	
					165					170					175		
30	Gly	Trp	Gln	Pro	Tyr	Asp	Ser	Arg	Ala	Met	Glu	Asp	Ser	Ile	Ala	Arg	
				180					185					190			
	Arg	Leu	Gln	Met	Asp	His	Asp	Val	Thr	Ile	Thr	Ser	Ser	Lys	Glu	Glu	
35			195					200					205				
	Ser	Gly	Thr	Leu	His	His	Phe	Asp	Pro	Glu	Thr	Arg	Leu	Leu	Thr	Ile	
	210						215					220					
40	His	Ala	Arg	Leu	Asn	Pro	Gly	Gln	Arg	Ala	Phe	Arg	Met	Ala	Thr	Glu	
	225					230					235					240	
	Leu	Gly	Tyr	Leu	Glu	Ala	Asn	Asp	Leu	Ile	Glu	Gly	Ile	Val	Asp	Asp	
					245					250					255		
45	Gly	Ile	Trp	Ser	Thr	Pro	Glu	Ala	Arg	Thr	Leu	Ala	Ile	Arg	Gly	Val	
				260					265					270			
	Ala	Ser	Tyr	Phe	Ala	Ala	Ala	Val	Met	Leu	Pro	Tyr	Lys	Ile	Phe	His	
50			275					280					285				
	Ser	Glu	Ala	Glu	Lys	Ser	Gly	Tyr	Asp	Ile	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gln	Leu	
	290						295					300					
55	Phe	Gly	Val	Gly	Tyr	Glu	Thr	Thr	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Thr	Leu	Gln	
	305					310					315					320	
	Arg	Pro	Asn	Leu	Arg	Gly	Ile	Pro	Phe	Thr	Phe	Val	Arg	Val	Asp	Arg	
					325					330					335		

Ala Gly Asn Met Ser Lys Arg Gln Ser Ala Thr Gly Phe His Phe Thr  
                             340                            345                            350  
 5 His Tyr Gly Gly Thr Cys Pro Leu Trp Asn Val Phe Glu Thr Phe Thr  
                             355                            360                            365  
 Asn Pro Gly Gln Val Leu Arg Gln Phe Ala Gln Met Pro Asp Gly Arg  
                             370                            375                            380  
 10 Asn Tyr Leu Trp Ile Ser Arg Thr Val Arg His His Glu Ala Arg Phe  
                             385                            390                            395                            400  
 Gly Glu Val Asp Lys Met Phe Ala Ile Gly Leu Gly Cys Glu Ala Arg  
                             405                            410                            415  
 15 His Ala Asp Arg Thr Val Tyr Ser Arg Gly Phe Asn Leu Gln Asp Leu  
                             420                            425                            430  
 20 Ser Thr Ala Thr Pro Ile Gly Ser Gly Cys Arg Val Cys Thr Arg Glu  
                             435                            440                            445  
 Asn Cys Ala Gln Arg Ala Phe Pro Ser Val His Gly Arg Ile Asn Ile  
                             450                            455                            460  
 25 Asp Ala His Glu Ser Thr Ile Ala Pro Tyr  
                             465                            470  
 30  
     <210> 3  
     <211> 19  
     <212> DNA  
     <213> Corynebacterium glutamicum  
 35  
     <220>  
     <223> Primer mikE17-int1  
 40  
     <400> 3  
     aatggatcac gatgtcacc 19  
 45  
     <210> 4  
     <211> 19  
     <212> DNA  
     <213> Corynebacterium glutamicum  
 50  
     <220>  
     <223> Primer mikE17-int2  
     <400> 4  
     tagtgggtga agtggaagc 19  
 55

## Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,  
enthaltend eine für das mikE17-Gen kodierende  
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
  - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist  
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid  
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No.  
2 enthält,
  - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das  
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens  
70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von  
SEQ ID No. 2,
  - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den  
15 Polynukleotiden von a) oder b), und
  - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15  
aufeinanderfolgende Nukleotide der  
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c) ,wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität des  
20 Transkriptionsregulators MikE17 aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt  
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid  
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die  
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend  
(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur  
5 Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
10 daß die Hybridisierung unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
- 15 8. Coryneforme Bakterien, in denen das mikE17-Gen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
9. Vektor pCR2.1mikE17int,
- 9.1 dessen Restriktionskarte in Figur 1 wiedergegeben  
20 wird, und der
- 9.2 in dem E.coli Stamm Top10/pCR2.1mikE17int unter der Nr. 14143 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ,  
25 Braunschweig) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt ist.
10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
30 daß man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure  
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man  
zumindest das mikE17-Gen oder dafür kodierende  
Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere  
ausschaltet,
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den  
Zellen der Bakterien, und
- 10 c) Isolieren der L-Aminosäure, wobei gegebenenfalls die  
Biomasse und/oder Bestandteile der Fermentationsbrühe  
in ihrer Gesamtmenge oder Anteilen im so erhaltenen  
Produkt verbleiben.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich  
15 weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-  
Aminosäure verstärkt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Bakterien einsetzt, in denen die  
20 Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet  
sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure  
verringern.
13. Verfahren gemäß Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
25 daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e),  
das (die) für das mikE17-Gen kodiert (kodieren)  
abschwächt, insbesondere ausschaltet.
14. Verfahren gemäß Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
30 daß man die regulatorischen Eigenschaften des  
Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das  
Polynukleotid mikE17 kodiert.

15. Verfahren gemäß Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,  
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme  
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig  
5 eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase  
kodierende Gen *dapA*,
- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-  
Dehydrogenase kodierende Gen *gap*,
- 10 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende  
Gen *tpi*,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende  
Gen *pgk*,
- 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase  
15 kodierende Gen *zwf*,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen  
*pyc*,
- 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase  
kodierende Gen *mgo*,
- 20 15.8 das für eine feed-back resistente  
Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen *lysE*,
- 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende  
Gen *hom*,
- 25 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen  
*ilvA* oder das für eine feed back resistente  
Threonin-Dehydratase kodierende Allel  
*ilvA(Fbr)*,

- 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase  
kodierende Gen *ilvBN*,
- 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase  
kodierende Gen *ilvD*,
- 5 15.14 das für das *Zwa1*-Protein kodierende Gen *zwa1*  
verstärkt bzw. überexprimiert.
16. Verfahren gemäß Anspruch 10,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme  
10 Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig  
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase  
kodierende Gen *pck*,
- 15 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase  
kodierende Gen *pgi*,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*
- 16.4 das für das *Zwa2*-Protein kodierende Gen *zwa2*  
abschwächt, insbesondere ausgeschaltet.
- 20 17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der  
Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens  
aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der  
beanspruchten Sequenz, trägt.
- 25 18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden  
Ansprüche,  
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium*  
*glutamicum* einsetzt.



19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu isolieren, die für den Transkriptionsregulator MikE17 kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des mikE17-Gens aufweisen,  
5           d a d u r c h   g e k e n n z e i c h n e t,  
daß man das Polynukleotid, enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungssonden einsetzt.

10

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

20 und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das mikE17-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.

Figur 1: Plasmid pCR2.1mikE17int

5

10

15

20

